

学校编码: 10384      分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

学            号: 9626002    U D C: \_\_\_\_\_

## 学   位   论   文

蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 穿梭表  
达质粒载体的构建和应用研究

欧   阳   青

指导教师: 杨汉金 教授、楼士林 教授 (厦门大学生物系)

申请学位级别: 硕   士                      专   业   名   称: 植

物   学

论文提交日期: 1999 年 8 月              论文答辩日期: 1999 年 8 月

学位授予单位和日期: 厦   门   大   学

1999 年 8 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

1999 年 8 月      日

## 摘 要

蓝藻是一类具有广泛适应性的光能自养型原核生物。由于蓝藻在细胞结构、代谢、遗传和进化等方面具有独特的性质,所以进入 90 年代后蓝藻基因工程不断蓬勃发展,成为藻类基因工程中极具生命力的一个领域。蓝藻作为转基因受体系统和生物反应器,兼具微生物和植物的优点,因此开发蓝藻作为基因工程受体细胞表达外源蛋白质有着重大的科学意义和应用价值。本研究以单胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 作为转基因受体细胞,构建相应的穿梭表达质粒载体,将目的基因转入蓝藻细胞中,筛选出能表达目的基因产物的转基因藻株,为进一步开发转基因蓝藻打下基础。

本研究对克隆在穿梭质粒 pPRS-1 上的 *Plectonema boryanum* 内源小质粒 pPbS 进行了测序,通过计算机分析,认为该质粒的复制起始区位于序列 567-1270 之间,克隆在 pPRS-1 中的蓝藻小质粒保持了复制起始区的完整性。为了使最终构建的穿梭表达质粒载体尽可能的小,首先对 5.8kb 的穿梭质粒 pPRS-1 进行改造,获得了 3.97kb 的穿梭质粒 pPRS-1',该质粒仍保留了 1.5kb 蓝藻内源质粒、 $Ap^r$  基因和大肠杆菌质粒复制起始位点。然后  $EcoR$  I、 $Sal$  I 双酶切质粒 pKYLX-71-35S,电泳回收其中含卡那霉素抗性( $Km^r$ )基因、CaMV35S 启动子、多克隆位点和 *rbcS* polyA 终止区的 6.5kb 的片段,经多次亚克隆与穿梭质粒 pPRS-1' 重组,得到穿梭表达载体 pPKE2。该载体上有大肠杆菌源质粒和蓝藻源质粒的复制起始位点,能在大肠杆菌和蓝藻中复制;有卡那霉素抗性选择标记、启动子、多克隆位点、终止区等部件,便于目的基因的插入、表达及重组子的筛选。将人工合成的 T $\alpha$ 1 基因片段(110bp)、PCR 扩增和连接的 UBT $\alpha$ 1 基因片段(380bp)经亚克隆后分别插入穿梭表达载体 pPKE2 CaMV35S 启动子下游的多克隆位点,获得了含目的基因的重组质粒 pPKET 和 pPKEUT。

重组质粒 pPKET 和 pPKEUT 分别自然转化单胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942,通过卡那霉素抗性筛选,获得了具卡那霉素抗性的转化藻株。经 Southern 杂交证实,目的基因 T $\alpha$ 1 基因、UBT $\alpha$ 1 基因已分别转入蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 细胞中,并用 Western 印迹法检测到了 UBT $\alpha$ 1 的表达产物。以上实验结果表明,本研究已成功地建立了的穿梭表达质粒载体系统,并且经试用,证实该系统能表达外源基因产物。

关键词: *Synechococcus* sp. PCC7942 穿梭质粒载体 胸腺素 $\alpha$ 1

## Abstract

The cyanobacteria are a diverse group of photosynthetic autotrophic prokaryote with high adaptability. Because of their characteristics of cytoarchitecture, metabolization, genetics and evolution, the studies on gene engineering of cyanobacteria boomed since 1990s. Cyanobacteria, as the receptor of gene-transforming system and as the biology reactor, show merits of microbe and plants concurrently. Thus the study on cyanobacteria as the receptor of gene engineering and their expression of foreign protein enjoys great significance in both theoretical and applied sciences.

In the experiment, *Synechococcus* sp. PCC7942, a species of unicellular algae, is used as the transgenic receptor cell to construct the corresponding shutter expression vector. Target gene is transferred into the cyanobacterial cells and the transformants, which can express the products of target gene, is screened out. Thus it has paved the way for further exploitation of transgenic cyanobacteria.

The experiment begins with the sequence determination of endogenous small plasmid pPbS of *Plectonema boryanum*, which is cloned into the shutter vector pPRS-1. Computer analysis indicates the location of the replication origin is between 567 and 1270, thus the replication origin of the small plasmid pPBS is considered intact. To make the shutter expression vector as small as possible, the 5.8kb shutter vector is reconstructed, and a smaller shutter vector pPRS-1' (3.97kb) is obtained, which preserves the 1.5kb endogenous small plasmid, Ap<sup>r</sup> gene and the replication origin of *E.coli* plasmid. EcoR I and Sal I are used to digest pKYLX-71-35S, and a 6.5kb fragment containing Km<sup>r</sup> gene, CaMV35S promoter, multiple cloning sites(MCS) and rbcS polyA terminator is obtained by electrophoresis. Then the fragment is subcloned and recombined with the shutter vector pPRS-1' to obtain the shutter expression vector pPKE2, which possesses the replication origins of *E.coli* plasmid and cyanobacterium plasmid. The plasmid pPKE2 also contains kanamycin resistance gene and CaMV35S promoter, MCS, terminator, which makes it convenient to insert and express target gene and to screen out the recombinants. The synthetical DNA fragment T $\alpha$ 1(110bp) and PCR-amplified DNA fragment UBT $\alpha$ 1 (380bp) are subcloned respectively into MCS, which is located at the downstream of the CaMV35S promoter of the shutter expression vector pPKE2, and the recombinant plasmid pPKET and pPKEUT are obtained.

The recombinant plasmid pPKET and pPKEUT are directly transformed into *Synechococcus* sp. PCC7942 respectively. The kanamycin-resistant transformants are obtained by kanamycin screening. Southern blotting analysis shows T $\alpha$ 1 gene and UBT $\alpha$ 1 gene have been transformed into *Synechococcus* sp. PCC7942 respectively. The expression product of UBT $\alpha$ 1 gene is examined by Western blotting analysis. The experiment demonstrates that the shutter expression vector system of *Synechococcus* sp. PCC7942 is constructed successfully. Some test shows that the

system can express the products of foreign genes.

Keywords: *Synechococcus* sp. PCC7942      shutter vector      thymosin  $\alpha$  1

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
前言	1
材料与方法	12
一 材料	12
二 实验方法	15
结果与分析	23
一 蓝藻 <i>Plectonema boryanum</i> 内源小质粒的测序与分析	23
二 蓝藻穿梭质粒载体的构建	25
1 对穿梭质粒 pPRS-1 的改造	25
2 含 CaMV 35S 启动子、MCS、rbc polyA 终止区和 Km <sup>r</sup> 基因的 DNA 片段的亚克隆	26
3 穿梭表达载体 pPKE2 的构建	28
三 含 T $\alpha$ 1 基因和 UBT $\alpha$ 1 基因的重组质粒的构建	31
1 目的基因 T $\alpha$ 1 (110bp) 的 PCR 扩增	31
2 含泛素基因 UB 的 328bp DNA 片段的 PCR 扩增	31
3 目的基因 UBT $\alpha$ 1 (380bp) 的 PCR 扩增	31
4 含 T $\alpha$ 1 基因的重组质粒-pPKET 的克隆	33
(1) 构建含 T $\alpha$ 1 基因的中介质粒 pET	33
(2) 具完整功能基因-T $\alpha$ 1 基因的重组质粒 pPKET 的克隆	34
5 含 UBT $\alpha$ 1 基因的重组质粒 pPKEUT 的构建	37
四 重组质粒 pPKET, pPKEUT 分别转化 <i>Synechococcus</i> sp.PCC7942	40
1 <i>Synechococcus</i> sp.PCC7942 对卡那霉素 (Km) 基础抗性的测定	40
2 重组质粒天然转化 <i>Synechococcus</i> sp.PCC7942	40
五 转化藻株的 Southern 杂交鉴定	42
1 探针的制备	42
2 Southern 杂交	42
六 pPKEUT 转化藻株的 Western 印迹鉴定	43
讨论	45
参考文献	48
致谢	56

# 前 言

## 一、蓝藻与基因工程

蓝藻是藻类中最古老、最原始的门类。其细胞结构与细菌类同，无细胞核及双层膜结构的细胞器，染色体 DNA 裸露，细胞壁结构为 G<sup>-</sup>，因此又被称为蓝细菌 (cyanobacterium)；但它们的光合系统类似于真核藻类及高等植物，含叶绿素 a (缺叶绿素 b) 和藻胆色素，具光系统 I (PS I) 和光系统 II (PS II)，能进行光解水放氧的高等植物类型的光合作用，因此也称蓝绿藻 (blue green algae)。

蓝藻约 150 属，2,000 余种，广泛分布于地球上的各个角落，从两极到赤道，从高山到海洋，从干旱的沙漠到高温泉水，到处都有它们的踪迹。蓝藻不仅能光合放氧，在地球大气从还原型向氧化型的转化中扮演着重要角色，而且上百种蓝藻具自生固氮的能力，是开拓不毛之地的先行者。有些蓝藻具放氢特性，可供开发清洁的能源。有些蓝藻富含蛋白质，是天然食物和饲料的蛋白资源。此外，有的蓝藻还能净化污水，可用来治理水体污染。由于蓝藻在细胞结构、代谢、遗传和进化等方面表现出独特的性质，多年来被广泛应用于研究光合作用、固氮作用、叶绿体起源及植物进化等重大生物学问题。特别是近年来，随着基因工程的兴起及对蓝藻分子生物学的深入研究，开发蓝藻作为基因工程的受体系统引起了生物工作者的兴趣和重视，研究进展迅速。

蓝藻作为转基因受体系统和生物反应器，兼具微生物和植物的优点：(1) 基因组为原核型，除了裸露的染色体 DNA 外，不含叶绿体 DNA 和线粒体 DNA，遗传背景简单，便于基因分析和检测外源 DNA。(2) 细胞壁主要由肽聚糖组成，无高等植物坚硬细胞壁的纤维素成分，便于外源 DNA 的转化。(3) 营光合自养生长，培养条件简单，成本低廉，只需光、CO<sub>2</sub>、无机盐和适当的温度就能满足生长需要，并且适于连续、静止等多种方式的培养。(4) 细胞体积大，能耐受高浓度的单一蛋白质，内源蛋白质更新速度慢，对外源蛋白质的容受力较高。(5) 很多种类含有内源质粒，为利用和改造这些质粒构建质粒载体提供了极好的条件。(6) 多数蓝藻富含人体和动物所必需的氨基酸和生理活性物质或前体，是食物及药物的重要来源，为基因工程产物直接食用提供了可能<sup>[1], [2]</sup>。由于蓝藻为遗传操作提供了诸多便利条件，进入 90 年代后蓝藻基因工程不断蓬勃发展，成为藻类基因工程中极具生命力的一个领域。

目前，成功应用于蓝藻的基因转化方法主要有以下几种：

### 1. 天然转化

天然转化是获得转基因蓝藻的最简单的方法。混合外源 DNA 和受体蓝藻细胞，在适宜的条件下悬浮培养，就完成 DNA 的转化。1970 年 Shestakov 与 Khyen

首先在 *Synechococcus* PCC 7943 中发现 DNA 的天然转化作用<sup>[3]</sup>。目前已确认可天然转化的蓝藻是不产生异形胞的单细胞种类，绝大多数属于 *Synechococcus* 与 *Synechocystis* 两个属，如 *Synechococcus* PCC7943、PCC6301、PCC7942、PCC7002、PCC73609、NKBG 042902-YG1116 和 *Synechocystis* PCC6714、PCC6308、PCC6803、PCC6906 等，除 *Synechocystis* PCC6308 需用  $\text{Ca}^{2+}$  诱导人工感受态外<sup>[4]</sup>，其它藻株都能有效地直接吸纳外源 DNA。在已进行的天然转化研究中，*Synechococcus* PCC7002 和 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 是仅有的海洋性蓝藻，并且 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 的天然转化效率不足对照淡水蓝藻的 1/10，据推测，这可能是由于藻体适应海水渗透势变化，在细胞壁上积累大量的多糖物质而阻碍了外源 DNA 的转入<sup>[5]</sup>。研究发现，蓝藻在各生长期均处于感受状态<sup>[3, 6-8]</sup>，但通常使用处于对数生长中期到后期的细胞进行转化。转化率与 DNA 浓度和藻细胞同 DNA 共保温的时间有关，转化过程中遮光或添加光合作用抑制剂可提高转化效率。但至今对蓝藻天然转化的机制仍不甚了解。

## 2. 接合转化

用质粒载体直接转化丝状蓝藻不易获得遗传上稳定的转化子。1984 年 Wolk 等人首先在 *Anabaena* 中建立了接合（conjugation）转化系统，这是丝状蓝藻基因转移系统的突破<sup>[9]</sup>。该系统由广宿主（broad-host-range）接合型质粒（如 RP4）、辅助质粒（具识别 *Bom* 位点的 *mob* 基因）和运载质粒（双向穿梭载体或整合载体）组成。使三种质粒位于同一 *E.coli* 宿主，然后与受体藻株混合，通过抗生素筛选即获得抗性藻落。接合质粒、辅助质粒由于无法复制或整合而逐渐丢失，运载质粒能够以自主复制的形式独立存在，或与蓝藻染色体或内源质粒发生同源重组而稳定存在。接合转化是目前可用于丝状蓝藻的有效基因转移方法，该系统经修改已成功应用于转化其它丝状蓝藻 *Nostoc*、*Calothrix*、*Plectonema*<sup>[10-13]</sup> 及单胞蓝藻 *Synechococcus*、*Synechocystis* 等<sup>[14]</sup>。在导入大 DNA 片段方面，接合转化比天然转化更有利，因为导入的 DNA 不象天然转化那样有随机切断的危险，还可增加获得单重组转化子（即部分二倍体）的可能性，并避免了胞外酶的问题<sup>[15]</sup>。

## 3. 电击转化

电击转化（electroporation）是借助高压电脉冲的作用在原生质体或细胞的质膜上形成可逆性的瞬间通道，从而使附着于质膜上的 DNA 分子进入原生质体或细胞内。该法是接合转化的一种更简单的替代方法，已成功地用于转化淡水和海洋蓝藻。Thiel 等（1989）用电击法将穿梭载体 pRL6 转化丝状蓝藻 *Anabaena* sp. M131，在高场强、短时间参数处理下获得了高的转化效率<sup>[16]</sup>。Takeyama 等在同一年也报道了用电击法转化海洋蓝藻 *Synechococcus* sp.，在  $\text{Ca}^{2+}$  和 15% 甘油的处理下获得了高频率转化子<sup>[17]</sup>。电击转化具有接合转化所不具备的一些优点：转化过程简单，仅需要外源 DNA 和清洗过的受体蓝藻细胞，无 *E.coli* 细胞的污染；

缺 Bom 位点的质粒(如 pUC 系列)亦可作为载体;可以在体外甲基化供体 DNA,并使供体 DNA 的构型由质粒扩展到线性 DNA 和染色体 DNA<sup>[18]</sup>。

#### 4. 其它转化途径

除了上述方法以外,近年来超声处理和基因枪轰击也被应用于蓝藻的基因转化。1995 年本实验室对蓝藻 *Chroococcus* sp.进行了超声转化的研究,运用此法在抗性平板上挑到了转化藻株,并在转化藻株中检测到了重组质粒 pPRS-1<sup>[19]</sup>。Matsunaga 等人于 1991 年将基因枪应用于海洋蓝藻 *Synechococcus* NKBG 15041C 的基因转化研究,其 DNA 承载体为一种细菌磁性粒子—BMPs,直径在 50~100nm,表面覆盖一层磷羧脂,运用 BMPs,将质粒 pSUP1021 成功地转化到受体蓝藻中,并证实了 CAT(氯霉素乙酰转移酶)活性<sup>[20]</sup>。

蓝藻基因转化途径的不断完善和发展,为在蓝藻中进行基因克隆和建立具有新遗传特性的株系打开了大门,而穿梭质粒载体的构建及在各种转化途径中的广泛应用为基因转化蓝藻奠定了基础。

## 二. 蓝藻穿梭质粒转化系统研究进展

自从 Asato (1973) 首次发现蓝藻质粒以来<sup>[21]</sup>,已在约 50% 被检的单细胞及丝状蓝藻中证实存在内源性质粒。质粒大小在 1.3~130kb 之间,大多数为 2~10kb,分子量在 1~80MD(百万道尔顿)之间,一个细胞内含质粒种类从 1~10 种不等。尽管已检测到极少数淡水蓝藻质粒在体内外转录和翻译的产物,如 Gruber 等(1987)检测到 *Anabaena nidulans* R2 的内源质粒 pANS 编码一 30KD 的蛋白;Schwabe 等(1990)将铜锈微囊藻 *Microcystis aeruginosa* 的内源质粒 pMA1 插入 pUC18 中构成重组质粒 pCMA1,转化 *E.coli* X984,发现在其细胞中新合成了两种多肽,分别为 50kD 和 43kD,但目前仍未找到蓝藻质粒编码功能的直接证据,因此蓝藻质粒仍属于隐秘型(cryptic)质粒<sup>[22]</sup>。研究表明,蓝藻毒性、抗药性与内源质粒无关<sup>[23, 24]</sup>。不同株系蓝藻质粒间具有一定的同源性,推测可能含有与细菌质粒相类似的可转移元件<sup>[25]</sup>。秦松等在重要经济蓝藻—钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中分离到内源质粒 pPBS,为全面开发改造该株系打下了良好的基础。根据从钝顶螺旋藻不同株系中分离到的质粒大小不同,他们认为蓝藻的内源质粒可能与藻体的形态分化有关<sup>[26]</sup>。本实验室从织线藻 *Plectonema boryanum* 中检测到一种 1.5kb 的小质粒 pPbS,并对它开展了遗传转化方面的研究<sup>[19, 27]</sup>。

由于蓝藻质粒属于隐秘型质粒,无可供利用的选择性标记,又不能在 *E.coli* 中复制,所以无法直接用作基因工程的载体。而细菌的一些质粒或人工构建的很多载体虽有选择性标记,但不能在蓝藻中复制维持或转化效率极低。因此,将蓝藻内源质粒与 *E.coli* 质粒及其衍生的质粒载体重组构建穿梭载体(Shuttle vector)



就成为蓝藻遗传操作的基本途径。这种杂合质粒含有两个复制起始位点，分别来自蓝藻质粒和大肠杆菌质粒，能在这两种生物中复制，便于利用二者的优势进行遗传操作。除此之外，大肠杆菌质粒还为穿梭载体提供了选择标记和便于外源基因插入的单一限制性内切酶酶切位点。

1980 年 Hondel 等人用含 Tn901 的 *E.coli* 质粒转化淡水蓝藻 *Anacystis nidulans* R2，由于 Tn901（携带  $Ap^r$  基因）插入蓝藻内源质粒 pUH24 中，第一次得到带  $Ap^r$  标记的杂合质粒 pCH1 及衍生质粒 pUC1<sup>[28]</sup>。将后者与 pCYC184 融合，首次获得了穿梭质粒 -pUC104 和 pUC105<sup>[29]</sup>。此后，许多研究者致力于改善穿梭载体的克隆潜力，提高转化效率。一方面将蓝藻内源质粒与 *E.coli* 质粒的特定位置重组，避免了杂合质粒上由于转座子介导的 DNA 随机插入而产生的不确定重排。另一方面通过删除穿梭质粒上不必要的隐蔽性 DNA 序列，引入多克隆位点，将载体的大小减至最小，扩充了载体容纳外源 DNA 片段的能力，并便于接受各种各样限制性内切酶切割后产生的外源片段。同时，补充新的选择标记，便于重组子的筛选，目前广泛应用于蓝藻穿梭质粒上的选择标记包括氨苄青霉素抗性（ $Ap^r$ ）基因、氯霉素抗性（ $Cm^r$ ）基因、卡那霉素抗性（ $Km^r$ ）基因和 LacZ<sup>+</sup> 基因等。除此之外，广泛应用于其它细胞系统的报告基因如 CAT 基因、LacZ 基因、和 Lux 基因、GUS 基因等也被引入蓝藻穿梭载体，用于检测外源基因的表达和确定启动子的作用<sup>[30-32]</sup>，并对建立有效的蓝藻受体系统及转化条件进行了专门的研究。到目前为止，已构建的蓝藻穿梭质粒载体主要有：pLS103<sup>[33]</sup>、pBAS 系列<sup>[34]</sup>、pCB4<sup>[35]</sup>、pAOE 系列<sup>[31,36]</sup>、pECAN 系列<sup>[35, 37]</sup>、pSG111<sup>[38]</sup>、pRL 系列<sup>[9,10,39,40,41]</sup>、pGL 系列<sup>[42]</sup>、pKB<sup>[37]</sup>、pPLAN 系列<sup>[43]</sup>、pFCLV7<sup>[44]</sup>、pCA<sup>[45]</sup>、pFF 系列<sup>[46]</sup>、pDAH 系列<sup>[47]</sup>、pJL 系列<sup>[48]</sup>、pRL243<sup>[49]</sup>、pDUCA7<sup>[50]</sup>、pKT230<sup>[51]</sup>、pPL2.7<sup>[52]</sup>、pJCF 系列<sup>[53]</sup>、pPBH201<sup>[54]</sup>、pSB2A<sup>[55]</sup>、pRL1050<sup>[56]</sup>、pSUP5011<sup>[57]</sup>、pFC1<sup>[58]</sup>、pPRS-1<sup>[27]</sup> 等。穿梭质粒载体的构建及完善大大推动了蓝藻基因工程的基础研究和应用研究。

不少工作证明，利用穿梭质粒转化系统可在蓝藻中表达包括真核基因在内的外源基因，成果令人鼓舞。Tandeau de Marsac（1987）以 pUC303 为载体，在单胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 中表达了原核基因芽孢杆菌杀幼蚊毒素基因<sup>[11]</sup>；此后，其它一些学者也开展了这方面的研究<sup>[59-63]</sup>，转基因藻株普遍具有良好的杀幼蚊毒性，这为蚊虫的生物防治开辟了新的途径。Fukuda 等人（1994）以 pUC303 为载体在 *Synechococcus* sp. PCC 7942 中表达了植物的乙烯合成酶基因<sup>[64]</sup>。孙军等（1994）将小鼠金属硫蛋白 - I（mMT-I）cDNA 基因片段与穿梭质粒 pDC-8 重组在固氮丝状蓝藻 *Anabaena* sp. PCC7120 中表达了金属硫蛋白，表达量约为 40  $\mu$ g MT/g 藻鲜重<sup>[65]</sup>；郭祥学等（1998）也在 *Synechocystis* PCC6803 中表达了 mMT-I cDNA，并证明转基因藻株对金属离子的抗性约为野生藻的 2



提高被环磷酰胺抑制的小鼠淋巴细胞转化功能和 NK (natural killer 天然杀伤细胞) 杀伤活性, 使血清可溶性白细胞 2 受体 (sIL-2R) 显著降低<sup>1691</sup>。张符光的研究表明, TQ 1 可提高小鼠抗辐射损伤、抗条件致病菌感染的效应<sup>1681</sup>。在临床上 TQ 1 广泛应用于治疗原发性胸腺发育缺陷、过敏反应、自身免疫疾病 (如系统性红斑狼疮)、慢性乙肝、丙肝等多种疾病, 与 PEG 修饰的 IL-2 并用可治疗艾滋病, 还可以作为治疗癌症的辅助药物, 并可抗老防衰, 副作用小, 疗效显著。

随着国内外接受胸腺素 (Q 1) 治疗的病人越来越多, 在传统注射剂型的基础上, 开发方便患者、减少治疗痛苦的口服剂型的研究日益受到重视。早在 1983 年, Werk 就用豚鼠作了胸腺提取物吸收实验, 证明口服胸腺提取物后, 肽类可以通过小肠壁, 并以整个分子的形式被吸收, 然后通过血液运送到不同的器官和组织中去<sup>1701</sup>。国外不仅有胸腺提取物的注射剂, 还有口服剂, 如胶囊剂、片剂等。德国用胸腺提取物生产片剂的历史较长, 主要产品有 “zell medinthymus200” 和 “thymus mulli”, 每片相当于 1g 新鲜胸腺, 在 80 年代初就广泛应用于临床, 并取得了良好的临床效果<sup>1701</sup>。我国学者也开展了胸腺素口服剂型的研究。何树庄等 (1994) 比较了胸腺肽片剂与注射剂的免疫作用, 发现口服胸腺肽 83mg/kg, 能明显提高小鼠的淋巴细胞转化率, 显著增加 E-玫瑰花环形成率, 并随剂量的增加, 其作用有随之增强的趋势<sup>1711</sup>。倪宏等 (1995) 观察口服小牛和猪胸腺素对免疫功能低下的小鼠的影响, 结果表明口服胸腺素可以提高小鼠的免疫功能, 未见种属差异和量效关系, 提示口服胸腺素具有临床使用价值<sup>1721</sup>。赵芳等 (1996) 研究了口服胸腺素对 S<sub>180</sub> 肉瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用, 结果证实口服制剂与注射制剂有相同的治疗作用, 可使肿瘤相对生长速度减慢, 肿瘤抑制率增加, 但量效关系不十分明显<sup>1731</sup>。吕继湘等 (1997) 报道用胸腺素胶囊治疗慢性乙肝 25 例的结果, 发现治疗组有效率为 52%, 明显高于对照组 (20%, P<0.05), 证明胸腺素胶囊对慢性乙肝有明显的治疗作用<sup>1741</sup>。国内外胸腺素口服剂的研究结果及临床实验说明, 口服剂与注射剂一样, 可以增强机体的免疫能力, 从而提高病人抗病能力, 这为我们以后利用转 TQ 1 基因的蓝藻制备成可直接食用的廉价药物提供了很好的依据。

目前, 纯 TQ 1 主要依靠化学合成或从猪和小牛胸腺细胞中提取, 价格昂贵。为获得价廉、质优、疗效好的胸腺素 Q 1 制剂, 国内外开始有人探索用基因工程方法生产 TQ 1。1980 年 Wetzel 等人通过重组 DNA 克隆技术, 把人工合成的 TQ 1 DNA 片段送入 *E.coli* 细胞, 成功地获得了表达, 表达产物具有与天然 TQ 1 相同的生物活性<sup>1751</sup>; 1989 年我国学者在 PWR590 株中表达 TQ 1 基因, 并用 SPA-ELISA 改良法检测了表达产物<sup>1761</sup>。但这些报道均未实现高效表达, 且表达产物需经进一步纯化才能利用, 成本高, 未见实际应用的报道。因此, 本研究希望通过穿梭表达载体的转化将 TQ 1 基因导入到蓝藻中, 得到表达胸腺素 Q 1 的转

基因藻株。若能选育出可口服的、培养简单、营养价值高、含胸腺素 $\alpha 1$ 的蓝藻，必将具有很大的经济效益和社会效益，造福于人类。

#### 四、泛素（Ubiquitin）及泛素融合系统的研究简介

真核基因在原核生物中的表达，为获得多种只以痕量水平存在于天然物种中的蛋白质提供了方便，并推动了对这些蛋白质结构和功能的研究。但是利用异源基因表达系统表达外源基因常遇到的一个问题是表达量低及表达产物不具生物活性。产物的低水平表达由许多因素决定，其中包括不能高效转录或翻译以及 mRNA 或蛋白质被宿主很快降解；有的蛋白虽能高水平表达，但由于不能正确折叠或翻译后修饰而无生物活性。为解决这一问题，在基因水平上常使用在宿主中具功能的强启动子、转录起始信号以及宿主偏好的遗传密码子；在蛋白质水平上则主要是利用分子伴侣（Molecular chaperones）促进肽链的正确折叠和稳定蛋白构象。近年来新开发的泛素融合（Ubiquitin fusion）系统是解决这一问题的另一新途径。

泛素（Ubiquitin, Ub），又称遍在蛋白质，由 76 个氨基酸残基组成，是真核生物中最保守的蛋白质之一。它在细胞特异性蛋白降解、染色体重建、蛋白质（重新）折叠和稳定蛋白构象等许多生化过程中扮演着重要的角色。运用 X-射线结晶学和 NMR（nuclear magnetic resonance，核磁共振）技术揭示，泛素的结构包括一致密的球状结构域和一羧基端的尾部区，尾部区由球状结构域延伸出来的最后 4 个氨基酸残基（Leu<sup>73</sup>-Arg<sup>74</sup>-Gly<sup>75</sup>-Gly<sup>76</sup>-COOH）组成，可在溶剂中自由摆动<sup>177</sup>。泛素融合系统是指泛素基因与外源基因融合表达，在融合蛋白中泛素位于目的蛋白质的 N 端成为前导序列。泛素融合基因的初级翻译产物是被尾部肽间隔的两个独立折叠的结构域，其中尾部肽 Arg<sup>74</sup>-Gly<sup>75</sup> 间的肽键是非特异性类胰蛋白酶的切割位点。一些天然的泛素融合蛋白基因已从真核生物中克隆和测序，融合蛋白的 N 端是泛素，C 端延伸有 52-80 个氨基酸<sup>178-179</sup>。

用 *E.coli* 和酵母细胞的实验表明，外源基因与泛素基因融合表达可大大提高外源基因的表达产量，并且几乎所有以泛素融合形式产生的蛋白都是具有生物活性的。Butt 等（1989）在 *E.coli* 中表达泛素融合的酵母金属硫蛋白（ub-MT）基因和泛素融合的促 G 蛋白（stimulatory G protein） $\alpha$  亚基（ub-Gs $\alpha$ ）基因，发现基因产物的产量从原来的不可检测增加到占细胞总蛋白含量的 20%，他们运用从兔网织红细胞中纯化的泛素-N<sup>端</sup>-蛋白水解酶（Ubiquitin-N<sup>端</sup>-protein hydrolase）裂解融合蛋白，得到了泛素和真正的目的蛋白<sup>180</sup>。Ecker 等（1989）比较了三种不同的蛋白质-UKP（人尿激酶的蛋白酶结构区）、sCD4（T 细胞受体蛋白的可溶性片段）和 Gs $\alpha$  在酵母细胞中以非融合形式和泛素融合形式表达的产量，证明与泛素基因融合后，基因表达可增加 4 至几百倍；用酵母内切蛋白

酶 ub-Xase 体内加工 ub-Gs $\alpha$  融合蛋白后, 获得的 Gs $\alpha$  具有与天然 Gs $\alpha$  相同的特异性和生物活性<sup>[77]</sup>。Sabin 等 (1989) 在酵母细胞中表达了融合的 ub- $\gamma$  INF (人  $\gamma$  干扰素) 和 ub- $\alpha_1$  PI ( $\alpha_1$ -蛋白酶抑制因子) 基因, 产生的融合蛋白经泛素-特异性蛋白酶精确裂解后获得了具正确 N 末端的  $\gamma$  INF 和  $\alpha_1$  PI, 而在细菌或酵母中直接表达这些蛋白质其 N 末端常增加一个由起始密码子衍生的 Met 残基<sup>[81]</sup>。Koken 等 (1993) 将 T7RNA 聚合酶系统与泛素融合系统联合, 在 *E.coli* 中超量表达了人 DNA 切除修复基因 -ERCC1, 蛋白表达量高达总蛋白的 40-50%<sup>[82]</sup>。

由于检测酵母细胞的 mRNA 水平未发现更多的泛素融合 mRNA, 暗示导致泛素融合蛋白表达增强的原因不是转录水平的提高和遗传信息的稳定性<sup>[77]</sup>。Butt 等人 (1989) 认为泛素融合系统提高表达量的机制可能是<sup>[80]</sup>: (1) 保护蛋白质的 N 末端。在 *E.coli* 中, 自由的 N 末端是短寿命蛋白的降解信号, 利用泛素分子对蛋白酶的抗性可保护融合蛋白免受 N 末端蛋白水解的作用。(2) 易化蛋白质的折叠。许多在 *E.coli* 中表达的异源蛋白不能正确折叠或形成不溶的蛋白包涵体, 泛素特有的折叠途径可能易化了融合蛋白的恰当折叠, 其结果使蛋白质保持可溶状态而具有生物活性, 并降低了对蛋白酶的敏感性。这种假说同样可解释泛素在分泌型生长因子受体和细胞表面受体中的作用, 受体的泛素化可能使这些疏水蛋白可溶, 并易化了它们向细胞膜的运输。泛素融合的人类固醇受体在 *E.coli* 中的表达显示, 高达 30% 的融合受体蛋白是可溶和具生物活性的, 而以非融合形式表达的受体蛋白一般不溶。尽管蛋白质的多聚泛素化 (Polyubiquitination) 被认为是蛋白质水解的信号, 但从上述研究结果来看, 泛素的非蛋白水解作用亦似乎有理。在这方面, 泛素的功能可能相似于热休克蛋白, Butt 提出泛素可能是真核系统中分子伴侣中的一种。(3) 高效翻译。泛素作为自然界最保守的蛋白质之一, 可能已进化到了最适合于生物使用的密码子, 因此, 泛素融合蛋白在原核生物中的高效表达是可能的。对酵母和 *E.coli* 中外源基因表达的研究也表明, 在相同的诱导条件下泛素融合蛋白产量显著增加。

泛素融合系统除了能提高表达水平和加工产生具功能的蛋白质外, 其另一优点是方便了目的蛋白质的纯化。融合蛋白中的泛素部分可作为泛素抗体柱纯化蛋白质的便利标记, 并且由于 N 末端融合的泛素是泛素特异性蛋白酶的天然底物, 因此用纯化的酶或含这种酶的细胞抽提物处理融合蛋白, 很容易在泛素和目的蛋白质之间精确地切断连接, 释放出目的蛋白质, 操作简单有效。本研究所构建的重组质粒之一就应用了泛素融合系统, 以期在蓝藻中实现外源基因 T $\alpha$ 1 基因的高效表达、产物的正确折叠和高的生物活性。

总之, 本研究旨在以蓝藻作为受体细胞, 构建蓝藻穿梭表达载体, 将胸腺素  $\alpha$ 1 基因转入蓝藻细胞中, 筛选出能表达胸腺素  $\alpha$ 1 的转基因藻株, 为开发口服含胸腺素  $\alpha$ 1 的蓝藻和进一步获得高效表达其他目的基因产物的转基因蓝藻

打下基础。本研究内容属于国家海洋“863”课题——“高效表达转人源胸腺素基因蓝藻开发技术”的一部分。

厦门大学博士论文摘要库

# 材 料 与 方 法

## 一、 材料

### 1. 菌种和质粒

大肠杆菌 JM101: 由肿瘤细胞工程国家专业实验室提供。

JM109: 购自华美生物工程公司。

质 粒 pEBFP: 由肿瘤细胞工程国家专业实验室提供。

pKYLX-71-35S: 由国外友人提供。

pPRS-1: 由本实验室构建、保存。

pUCUB: 由中科院上海生物工程研究中心克隆提供。

### 2. 单胞蓝藻 *Synechococcus* sp.PCC7942: 由中科院水生生物研究所提供

### 3. PCR 引物: 由中科院上海生物工程研究中心合成

#### (1) T $\alpha$ 1 引物:

T1 (5' 端引物): 5' -GGGCATGCAAGGATCCGACGCAGCT  
Sph I BamH I

GTTGACACCAGCTCCGAAATCACCACCAAAGACTTAAAGG-3'

T2 (3' 端引物): 5' -GGGTCGACTAGTTTTCTGCTTCTTCA  
Sal I Spe I

ACAACCTTCTTTTTTTCCTTTAAGTCTTTGGTGGTGATT-3'

#### (2) UB 引物:

U1 (5' 端引物): 5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'

U2 (3' 端引物): 5' -AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'

#### (3) UBT $\alpha$ 1 引物:

U1 (5' 端引物): 5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'

T3 (3' 端引物): 5' -GGGTCGACTAGTTTTCTGCTTCTTC-3'  
Sal I Spe I

### 4. 主要试剂:

限制性内切酶 Hind III、EcoR I、Sal I、Pst I、EcoR V、Pvu II、Xba I、Spe I、Sph I、BamH I,  $\lambda$  DNA/EcoR I + Hind III Marker,  $\lambda$  DNA/Hind III Marker, pBR322/Hae III Marker, T4 DNA 连接酶, dNTP, Taq DNA 聚合酶等购自华美生物工程公司。

溶菌酶为上海东风生化技术公司产品。

基因纯 DNA 片段快速回收试剂盒由普宁生物技术(厦门)公司提供。

尼龙膜为 Millipore 公司产品 (孔径 0.45  $\mu$ m); FVDF 蛋白质印迹膜为 Boehringer Mannheim GmbH(Germany)公司产品。

DIG 引物标记和检测试剂盒 I 为 BOEHRINGER MANNHEIM 公司产品。  
其余试剂均为国产分析纯试剂。

## 5.常用培养基

- (1) LB 培养基: NaCl 1%, 酵母提取物 0.5%, 蛋白胨 1%, 琼脂 1.75%  
(固体培养基), pH 7.0。
- (2) BG-11 培养基: 参见文献 83, 固体培养基添加 1.0%的琼脂。

## 6.常用溶液的配制

### (1) 碱法提取质粒用液:

溶液 1(裂解缓冲液): 葡萄糖 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L (pH 8.0), 高压灭菌, 4℃保存。

溶液 2: NaOH 0.2 mol/L, SDS 1%, 现用现配。

溶液 3: NaAc 0.5 mol/L, pH 4.8。

TE 缓冲液: Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1mmol/L, pH 8.0。

### (2) 蓝藻质粒提取用液:

SE 缓冲液: NaCl 0.12 mol/L, EDTA 0.05 mol/L, pH 8.0。

20% SDS 溶液: 将 20 克固体 SDS 42℃水浴溶解于 70ml 蒸馏水中,  
然后定容至 100ml。

5mol/L NaCl溶液: 称取 29.22 克 NaCl, 加蒸馏水溶解并定容至 100ml。

- (3) 50×TAE 电泳缓冲液: Tris 242 克, 冰乙酸 57.1ml, 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 100ml, 定容至 1000ml。

- (4) 琼脂糖凝胶电泳上样缓冲液(6×): 溴酚蓝 0.25%, 蔗糖 40%。

### (5) Southern 杂交用液:

变性缓冲液: NaCl 1.5 mol/L, NaOH 0.5 mol/L。

中和缓冲液: Tris-HCl 1 mol/L, pH 8.0, NaCl 1.5 mol/L。

20×SSC 缓冲液: 800ml 水中溶解 175.3 克 NaCl和 88.2 克柠檬酸钠,  
加数滴 10 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 定容至 1000ml。

杂交液: 5×SSC, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1×  
blocking。

洗膜液 I : 2×SSC, 0.1%SDS。

洗膜液 II : 0.1×SSC, 0.1%SDS。

杂交缓冲液 1: 马来酸 0.1 mol/L, NaCl 0.15 mol/L, 加固体 NaOH 调至  
pH 7.5。

杂交缓冲液 2: 用马来酸缓冲液稀释 DIG 试剂盒中 10×blocking 溶液成  
1×blocking 溶液。

杂交缓冲液 3: Tris-HCl 0.1 mol/L, NaCl 0.1 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 50mmol/L, pH



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库